

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-527953

(P2003-527953A)

(43) 公表日 平成15年9月24日 (2003.9.24)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	マーク ⁸ (参考)
B 01 L 3/14		B 01 L 3/14	2 G 0 5 2
C 12 M 1/00		C 12 M 1/00	A 4 B 0 2 9
1/12		1/12	4 G 0 5 7
1/24		1/24	
G 01 N 1/10		G 01 N 1/10	B
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)		

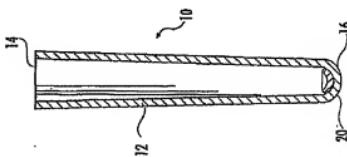
(21) 出願番号 特願2001-568587(P2001-568587)	(71) 出願人 デワルチ テクノロジーズ、インコボレ イテッド
(36) (22) 出願日 平成13年3月21日 (2001.3.21)	アメリカ合衆国、テキサス、ヒュースト ン、 ウィンウッド 6850
(35) 離脱文書提出日 平成14年9月24日 (2002.9.24)	(72) 発明者 デワルチ、ビンツ アメリカ合衆国 テキサス、ヒュースト ン、 ウィンウッド 6850
(36) 國際出願番号 PCT/US01/09090	(74) 代理人 弁理士 浅村 錠 (外3名)
(37) 國際公開番号 WO 01/070402	F ターム (参考) 2G052 AA28 AD29 DA02 EA03 ED17 4B029 AA09 AA23 BB20 CC02 HA02 HA06 4G057 AB01 AB38
(37) 國際公開日 平成13年9月27日 (2001.9.27)	
(31) 優先権主張番号 09/532,599	
(32) 優先日 平成12年3月22日 (2000.3.22)	
(33) 優先権主張国 米国 (U.S.)	
(31) 優先権主張番号 09/658,017	
(32) 優先日 平成12年9月12日 (2000.9.12)	
(33) 優先権主張国 米国 (U.S.)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名稱】 単一容器内での物質の処理方法および器具

(57) 【要約】

本発明の一実施形態例において、開いた端部および閉じた端部を有する容器が提供される。この容器は遮過手段をさらに含む。通常この遮過手段は容器の閉じた端部の近くに置かれる。次に、管もしくは容器の閉じた端部に穴を開けることができ、この穿孔された開口部を通して液体および不要産物を容器から除去できる。別の実施形態例において、少なくとも1つの物質を保持することができる容器内で少なくとも1つの物質を処理する方法が提供される。この方法は容器に少なくとも1つの物質を導入することを含む。この方法は少なくとも1つの物質を処理することをさらに含む。この方法は、容器に開口部をつくること、および開口部を通して少なくとも1つの物質を除去することをさらに含む。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 流体試料を調製するための管であって、開いた端部および閉じた端部を有する中空で円筒状の本体、および試料流体から所望の物質を選択的に保持するための濾過手段であって、管の閉じた端部の近傍で本体内に配置される上記濾過手段、からなる上記管。

【請求項2】 少なくとも1つの物質を保持できる容器内で少なくとも1つの物質を処理する方法であって、少なくとも1つの物質を容器に導入すること、少なくとも1つの物質を処理すること、容器に開口部をつくること、および、開口部を通して少なくとも1つの物質を除去すること、からなる上記方法。

【請求項3】 濾過手段を挿入することをさらに含む請求項2記載の方法。

【請求項4】 濾過手段がフィルターである請求項3記載の方法。

【請求項5】 少なくとも1つの物質がフィルターをさらに含む請求項2記載の方法。

【請求項6】 容器が試験管である請求項2記載の方法。

【請求項7】 開口部をつくることが容器に穴を開けることをさらに含む請求項2記載の方法。

【請求項8】 開口部を通しての望ましくない流体流出を防ぐために、試験管の開いた端部をシールすることからなるステップをさらに含む請求項2記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の分野)

本発明は一般に物質の処理に関し、特に単一容器内で物質を処理する方法および装置に関する。

【0002】

(発明の背景)

最近の研究の最先端では、様々なプロセス、例えばDNA塩基配列決定などを能率的にするための努力が増えている。塩基配列決定のための核酸試料精製の現行プロトコールは遠心ステップを含み、これは目標とする核酸およびいくつかの不要産物(waste products)を含む試料物質から固体物を沈降させるために用いられる。試料のロスなしにこのステップを実施しなければならないので、遠心は、底部分が完全にシールされた試料容器で実施されねばならない。

【0003】

これらのプロトコールの多くはまた濾過ステップも含み、核酸および不要産物を含む試料物質は濾過手段を通過する。フィルター材料は、目標の核酸に選択的に結合し、一方液体および不要産物を流通させる。濾過後に不要産物および液体を除去する必要があるので、このステップは、濾過手段の下に開口部をすでに備える試料容器で実施されねばならない。このような容器の例は米国特許第4,683,058号(1987、Lyman et al.)、5,264,184号(1993、Ayasta et al.)、および5,910,246号(1999、Walter et al.)に示されている。これらの教示を参照により組み込む。

【0004】

これら2つのステップのための容器要件は両立しないので、閉じた容器(遠心に使用される)から開口部を備える容器(濾過ステップに使用される)に試料を移動しなければならず、このことは全プロセスに1ステップを追加する。さらに、閉じた容器(通常プラスチックの試験管)は移動の後で捨てられる。もし同一

の容器もしくは試験管を遠心および濾過ステップの両方に用いることができれば、時間のかかる移動ステップを省くことができ、発生する固形不要物の量を減らすことができる。このため、単一容器で物質を処理する方法および装置が長い間求められている。

【0005】

DNAの塩基配列決定は研究施設の制御された環境で専ら行なわれてきた。質の高いデータを確保するために、現在の施設のプロトコールでは、熟練した技術者だけがなし得る多くの精密な手作業が実施される。これらの個々の操作のいくつかを実施するために多くの機器が存在するが、操作の全数は多いまであり、またこれらの機器の各々はやはり熟達した管理を必要とする。さらに、プロセスにおける各追加ステップは誤りの潜在的源泉である。塩基配列決定プロセスで特に時間のかかる部分は、DNAがクローン化された培養菌体からDNAテンプレートを単離し精製することである。DNAテンプレートを調製する既存の多くの方法は標準的な96ウェル・フォーマットに適合するようになっており、そのフォーマットでは試料は、それぞれが96個の管もしくは試料ウェルを含むトレイまたはプレートでバッチ処理される。このような方法の1つが、Ander ss on et al., Method for 96 well M13 DNA Template Preparations for Large-Scale Sequencing (大規模な塩基配列決定のための、96ウェルでのM13テンプレートDNA調製方法), BioTechniques (June 1996) に開示されている。このような方法の別の例が、Qiagen IncorporatedのQIAprep 96 M13 Protocol, QIAprep M13 Handbook (2/99) に開示されている。これらの参照文献を本明細書に参照により組み込む。

【0006】

最近の研究動向により、遺伝物質の配列決定およびマッピングのための、大規模で高速の技術に対する大きな要望が生じた。テンプレート調製プロセスのあるものもしくは全部を自動でおこなういくつかの一体化された装置が開発されたが、これらの装置は通常、あるステップをなくすかもしくは統合しようとしている。

なく、従来の方法の手作業をそのまま繰り返す。さらに、これらの方法の多くは高価で非常に特殊な試料容器を使用する必要があり、これら容器は本質的にそのこと以外の他の役に立たない。このタイプの方法は米国特許第5, 610, 074号 (Beritashvili et al., 1997) および5, 863, 801号 (Southgate et al., 1999) に開示されており、これらを参照により本明細書に組み込む。このように、単一容器で物質を処理する方法および装置が長い間求められている。

【0007】

(発明の概要)

一実施形態例では、少なくとも1つの物質を保持できる容器内の少なくとも1つの物質を処理する方法が提供される。この方法には少なくとも1つの物質を容器に導入することが含まれる。この方法には少なくとも1つの物質を処理することがさらに含まれる。この方法には容器に開口部をつくること、およびその開口部を通して少なくとも1つの物質を除去することがさらに含まれる。

【0008】

本発明の別の一実施形態例では、開いた端部および閉じた端部を有する容器が提供される。この容器は濾過手段をさらに備える。通常この濾過手段は容器の閉じた端部の近くに置かれる。次に、容器の閉じた端部に穴を開けることができ、この穿孔された開口部を通して液体および不要産物を容器から除去できる。

【0009】

さらなる実施形態例において、単一容器で物質を処理する改良された方法が提供される。一実施形態例は培養菌体からDNAテンプレートを調製することを対象とする。この方法には、管もしくは容器をつくるために標準的なプラスチック管にガラス纖維フィルターを挿入することが含まれる。この方法には、管または容器にPEG溶液を加えることがさらに含まれる。この方法には、管もしくは容器にM13ファージの上清を加えることおよびPEG溶液とM13ファージ上清を混合してファージを沈殿させることが含まれる。この方法にはまた、遠心によりファージをペレット化することならびに管もしくは容器の閉じた端部に穴をあけて開口部を作り出すことが含まれる。この方法にはまた、管の開口部側端部を

減圧により開口部を通して余分な液体を除去することが含まれる。この方法にはさらに、管もしくは容器に過塩素酸ナトリウム溶液を加えることにより、DNAからファージタンパク質を解離することが含まれる。この方法にはさらに、管の開口部側端部を減圧することにより開口部を通して余分な液体を除去することならびに管もしくは容器にエタノール溶液を加えることによりフィルターに結合したDNAを洗うことが含まれる。この方法にはまた、管の開口部側端部を減圧することにより開口部を通して余分な液体を除去することならびに管もしくは容器にTEバッファ溶液を加えることが含まれる。この方法にはさらに、管もしくは容器の開いた端部に陽圧を加えることにより、開口部を通してコレクション・ウェルにDNAを溶離することが含まれる。

【0010】

(発明の例示的実施形態の詳細な説明)

本発明の一実施形態例において、物質を処理する装置が提供される。図1を参照すると、容器あるいは試験管10が、開いた端部14および球状の閉じた端部16を有する中空の円筒形本体12を備える。ある実施形態例では、試験管もしくは容器10は熱可塑性材料からなる。別の実施形態では、当分野の技術者が思い浮かべるであろう適切な何らかの材料および適切な何らかの形状が用いられる。濾過手段20はガラス纖維紙のディスクを備え、これは試験管に押し込まれて、最終的には紙が容器の閉じた端部の形状に沿うようになっている。別の実施形態においては、濾過手段は、試料物質からの目的物質を選択的にまた再び外せるような仕方で保持する適切な何らかの材料を含むことができる。別の実施形態においては、これらの濾過手段はビーズーほんの少數の具体名を挙げれば、Banks Laboratories, Inc. により市販されるものなどのガラス・ビーズおよびマイクロスフィアなど、顆粒状物質、ゲル、シリカゲル、固体物質、容器への化学処理、あるいは当分野の技術者が思い浮かべるであろう他の何らかの濾過手段である。

【0011】

図2を参照すると、別の実施形態の試験管30が、開いた端部34および平坦な閉じた36を有する円筒形本体32を備える。濾過手段40は、それが試験管

に完全に押し込まれたとき平坦なままである。図3は、濾過手段46が多数のガラス・ビーズを含む、別の実施形態の容器もしくは試験管44を示す。図4は、濾過手段52がゲルを含む、別の実施形態の試験管50を示す。様々な実施形態において、このゲルはシリカゲルあるいは当分野の技術者が思い浮かべるであろう他の何らかのゲルである。

【0012】

図5を参照すると、別の実施形態の試験管もしくは容器56が、閉じた端部60の内側に配置された半球上の凹み部分58を含む。濾過ステップの前に管に穴を開けるとき、凹みにより、穿孔器具62が濾過手段64を乱すことなく試験管材料を完全に貫き通すことができるようになる。図6は、濾過手段72が試験管に部分的に挿入されているにすぎない、別の実施形態の試験管もしくは容器70を示す。濾過手段はカップ（cup）に形作られており、これは濾過手段を試験管の側面に対する楔とする役に立っており、濾過手段をしかるべき位置に保つ。試験管の濾過手段と閉じた端部76の間の空隙74により、穿孔器具が濾過手段を乱すことなく試験管材料を完全に貫き通すことができるようになる。言うまでもなく、別の実施形態においては濾過手段は乱される。

【0013】

図7は、濾過手段が2つの独立した層82aおよび82bを備える、別の実施形態の試験管もしくは容器80を示す。穿孔器具84が管に深く入りすぎて濾過手段と接触した場合、下側の層82aが保護緩衝材として作用して上側の層82bが乱されることを防ぐ。

【0014】

本発明のさらに別の実施形態において、濾過手段は、濾過または保持することに役立つかあるいは当分野の技術者が思い浮かべるであろう他の処理を提供する物質もしくは化学品である。別の実施形態においては、濾過手段は完全に省かれかあるいは沈殿、温浸、または当分野の技術者が思い浮かべるであろう他の化学反応もしくは処理などの他のタイプの処理を実施するために添加される物質であってもよい。さらに別の実施形態において、濾過手段は容器の性質である。

【0015】

図8aは、管もしくは容器の閉じられた端部94の中央から放射状に配置され、92などの一体をなす線状支持手段を有する、別の実施形態の試験管もしくは容器90を示す。支持手段は濾過手段（示されていない）を閉じられた端部から離す。閉じられた端部の中央と濾過手段を引き離す空隙96により、穿孔器具が濾過手段を乱すことなく試験管材料を完全に貫き通すことができるようになる。支持手段の間の、98などの空隙は液体および不要産物の流路を提供して濾過ステップに必要とされる時間を減らす。

【0016】

図8bは、管の閉じられた端部114の中央の回りに環状に配置される、112などの一体をなす弧状支持手段を有する、別の実施形態の試験管もしくは容器110を示す。支持手段は濾過手段（示されていない）を閉じられた端部から離す。閉じられた端部の中央と濾過手段を引き離す空隙116により、穿孔器具が濾過手段を乱すことなく試験管材料を完全に貫き通すことができるようになる。支持手段の間の、118などの空隙は液体および不要産物の流路を提供して濾過ステップに必要とされる時間を減らす。別の実施形態において、一体をなす支持体は適切な何らかの形状、形態、もしくは数であってよい。ここでも、こうなつていよい実施形態において、フィルターは穿孔により乱されるが依然として有用な結果を与える。

【0017】

図9は、試験管もしくは容器の閉じられた端部104の内側に配置された、102などの溝を有する、別の実施形態の試験管もしくは容器100を示す。閉じられた端部の中央と濾過手段（示されていない）を引き離す空隙106により、穿孔器具が濾過手段を乱すことなく試験管材料を完全に貫き通すことができるようになる。溝は液体および不要産物の流路を提供して、濾過ステップに必要とされる時間を減らす。別の実施形態において、溝は適切な何らかの形状、形態もしくは数であってよい。

【0018】

本発明のさらなる実施形態において、流体試料を調製するための管もしくは容器が提供される。管もしくは容器は中空の本体を備える。一実施形態において、

この容器は開いた端部および閉じた端部をもつ。別の実施形態において、この容器は端部をもたないかあるいは全く閉じられている。さらなる実施形態において、容器は試料流体からの目標物質を選択的に保持するための濾過手段を備える。濾過手段は管の閉じた端部に近い本体内部に配置される。

【0019】

さらなる実施形態において、フィルター・ペーパーがカップに成形される。さらなる実施形態において、濾過手段は2層以上のフィルター・ペーパーを備える。さらなる実施形態において、フィルター・ペーパーはガラス纖維を含む。

【0020】

さらなる実施形態において、管は濾過手段および管の閉じた端部の間に介在する間隙を備える。さらなる実施形態において、この間隙は濾過手段を支持する支持手段により保たれる。さらなる実施形態において、支持手段は管の閉じた端部の中央から放射状に配置される1個または複数の線状突起を備える。さらなる実施形態において、支持手段は管の閉じた端部の中央の回りに環状に配置される1個または複数の弧状の突起を備える。さらなる実施形態において、管は管の閉じた端部の内側に配置された凹部分を備える。さらなる実施形態において、この凹み部分は一般に管の閉じた端部の中央に位置する。さらなる実施形態において、この凹み部分は1個または複数の溝を備え、この溝は一般に管の閉じた端部の中央を通る。

【0021】

ここで別の実施形態例に移ると、单一の容器で物質を処理する方法が提供される。本実施形態例においては、ガラス纖維フィルターが標準的なプラスチックの試験管もしくは容器に挿入される。当分野の技術者が思い浮かべると思われる適切なガラス纖維フィルター・ペーパーの一例は、Whatman Cat. # 09-874-40A。図10を参照すると、試験管もしくは容器1010が開いた端部1012ならびに球状の閉じた端部1016に向かって次第に細くなる薄い壁面の円筒形本体1014をもつ。フィルター1020は、材料のシートもしくは連続ロールから切り取るかあるいは打ち抜くことができるガラス纖維ペーパーからなる薄い円形のディスクである。図11を参照すると、いったんフィルタ

—1020が試験管1010に完全に挿入され、そしてフィルター1020と管1010の閉じた端部1016との間にわずかな間隙を残して位置付けられる。この間隙1140は、試料材料を妨げ、また流体が後のステップの間にフィルター・ペーパー1020を通してより確実に通過する助けとなる。次に、さらなる実施形態例において、170マイクロリットルの第1の試薬がHydraに吸引される。この第1の試薬は、単離しようとしている物質の凝集と沈殿を促進する何らかの物質である。適切な第一の試薬の一例は、以下の割合の、以下の試薬からなるポリエチレングリコール溶液（PEG）である：200gのPEG（Sigma Cat. #P-2139）；146gのNaCl；1000mlとする、適量の無菌のH₂O。

【0022】

PEG溶液の吸引に先立ち、M13培養菌体を別の試験管、容器あるいはその他の類似の試料容器でインキュベートする。次に、試料を遠心して細胞と残渣を除去する。M13培養体を調製する前記方法はよく知られており、本発明の部分とは見なされていない。次に、一実施形態例においては、M13ファージDNAを含む、400マイクロリットルの遠心上清を第1の試薬（今の場合PEG）を含むHydraに吸引する。上清とPEGの混合物をHydraからフィルター・ペーパーを含む管または容器に移す。このとき、吸引と分配のサイクルを3回繰り返すことにより上清とPEG溶液を十分混合して、上清とPEGがよく混合された溶液とする。次に、この混合液を4℃で30分間インキュベートする。

【0023】

インキュベーションの後、さらなる実施形態においては、この混合物を同一の試験管あるいは容器で遠心し、管の閉じた端部にファージをペレット化する。図12に示されるように、ここで試験管1010はフィルター1020、上清流体1222、およびペレット化ファージ1224を含む。次に、管または容器1016の閉じた端部に、刃もしくは針1226あるいは開口部を作り出すことができる他の器具により、開口部1228を作るために穴をあける。刃もしくは針1226の移動距離は、刃もしくは針1226は試験管1010の壁面を完全に貫通するが、フィルター1020を完全には貫通しないように、制限される。この

実施形態例において、開口部1228は、流体がなくなる前に次の操作における反応が可能であるような十分遅い速さで重力による漏出が起こるような大きさである。図13を参照すると、ここではテスト、管1010の閉じた端部1016が減圧され、一方管1010の開いた端部1012は周辺圧力のままである。開口部1228を跨ぐこの圧力差により、上清流体1222がフィルター1020を通って、そして開口部を通って管から流出する。

【0024】

次に、第2の試薬を管または容器に加えるが、この実施形態においては、これはDNAからファージタンパク質を解離させるためにおこなわれ、また約5.2ミリリットルの容積を加える。第2の試薬の例は、以下の割合の、以下の試薬からなる6.5M過塩素酸ナトリウム溶液などの何らかのdekaotropic塩溶液でありうる：456.63gの過塩素酸ナトリウム（Sigma Cat. #51401-500G）；5mlの1Mトリス-HCl（pH 8.0）；100マイクロリットルの0.5M EDTA（pH 8.0）；500mlとする、適量の無菌のH₂O。次に、再び管の閉じた端部を減圧して過塩素酸ナトリウム溶液を除去する。このときDNAはフィルターに付着している。次に、第3の試薬を管または容器に加えて、ファイルに付着したDNAから余分なタンパク質、塩および他の残渣を洗い取る。適切な第3の試薬の一例は以下の割合の、以下の試薬からなる75%エタノール溶液である：525mlの100%エタノール（200ブルーフの、AAPER Alcohol & Chemical Co., DSP-KY417）；175mlの無菌H₂O。次に、前のステップと同様のやり方で、エタノールを除去するために減圧にする。

【0025】

次に、第4の試薬を管に加える。適切な第4の試薬の一例はTEバッファなどの生物学的懸濁バッファおよび2価カチオン・スカベンジャーを含む何らかの物質である。TEバッファの例の適量は45マイクロリットルであり、以下の試薬を含む：トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン（トリス、TRIS）およびエチレンジアミン四酢酸（EDTA）。図14を参照すると、次に、管または容器1010の開いた端部1012に陽圧を加えて、DNAを試料容器1430に

溶離させる。開口部1228を跨ぐ圧力差により、DNAをフィルター1020から、開口部を通って容器30へと溶離させる。精製DNAは次の増幅、配列決定、試験、または保管の準備が整っている。管または容器アセンブリは棄てられる。

【0026】

本発明の様々な実施形態には流体を試験管または容器に分配することが含まれる。手動ピッペッター、自動流体ディスペンサー、もしくは制御量の流体を分配する他の適切な何らかの方法あるいは流体を1つの容器から別のものに移動させる他の適切な何らかの方法を用いて、これらの実施形態のそれぞれを実施することができる。さらなる実施形態において、管の内容物の混合が往復運動式もしくは渦式機械混合機を用いて行われる。さらに別の実施形態において、混合はまた、手動ピッペッターもしくは当分野の技術者が思い浮かべるであろう他の混合手段を用いておこなわれる。

【0027】

従来技術の方法の多くのステップおよび操作はマルチ管・フォーマットで実施される。マルチ管・フォーマットの例は標準的な96ウェルもしくは384ウェル・フォーマットであり、試験管、フィルター・プレート、コレクション・ウェル、および他の部品が8x12もしくは16x24配列に配置されている。トレイおよびホルダーの寸法は標準化されており、多くの遠心機、乾燥機、流体ディスペンサー、および自動ピッピング装置がこのフォーマットに適合するようデザインされている。本発明の様々な実施形態において、前記の装置の使用を容易にするために、いくつかのあるいは全てのステップがマルチ管・フォーマットを用いて実施される。勿論、別の実施形態においては、非標準的寸法のトレイおよびホルダーが用いられる。図15は、8x12配列もしくは他の適切なフォーマットに配置することができる穴1534をもつ管・キャリア1532に挿入されている、1010などの試験管を示す。別の実施形態においては、容器またはキャリアは單一ユニットである。一実施形態において、この單一ユニットはキャリアに恒久的に付着する容器である。あるいは別の実施形態において、2個以上の容器を提供する、形作られた凹みが組み込まれた單一成形キャリアが提供さ

れる。

【0028】

本発明の別の実施形態において、フィルターは手で、もしくはこの目的のためにデザインされた自動装置により挿入される。またこのような装置を、单一ステップで材料のシートもしくはロールからフィルターを打ち抜き、それらを試験管に挿入するようにすることもできるであろう。別の実施形態においては、選択的にまた再び外せるような仕方で目的物質および不要産物を保持するであろう何らかの手段により、フィルターを置き換えることができる。別の実施形態では、フィルターが全くなく、処理ステップの何れかで加えられる物質が含まれるだけである。

【0029】

別の実施形態において、試験管もしくは容器に穴をあけることは一度に1つの管もしくは容器に、あるいはマルチ管もしくは容器フォーマットにおいて行われる。様々な実施形態において、カッティング力は、アーバープレス (a r b o r p r e s s) を用いて手により、流体動力シリンダーにより、あるいは力を与える他の適切な何らかの手段により供給される。別の実施形態において、管の装填および取り出しとカッティング操作自体は自動化されている。さらに別の実施形態において、管は任意の材料でできており、その開口部は適切な任意の手段によりつくられる。

【0030】

別の実施形態において、本発明の方法には、開口部を通しての、重力による流体の流出を防ぐために、試験管の開いた端部を一時的にシールするさらなるステップが含まれる。ある実施形態において、開口部は、開口部内の流体の表面張力が開口部を通しての漏出を防ぐのに十分であるような大きさである。

【0031】

本発明の実施形態例の様々なステップには、開口部を跨ぐ圧力差の影響下に、試験管の開口部を通して流体を押し出すことが含まれる。様々な実施形態において、減圧、陽圧、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の何らかの方法が、必要な圧力差を作り出すためにこれらのステップの何れかにおいて用いら

れる。別の実施形態においては、慣性もしくは遠心力などの、当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の適切な何らかの手段が、試験管から出るように流体を強制するために用いられる。さらに別の実施形態において、DNA、RNAなどの物質、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の目的物質の溶離はまた遠心により実施される。

【0032】

別の実施形態において、本発明の方法は、目的物質を、目的物質および1つまたは複数の不要物質を含む試料物質、固体、プラズマもしくは気体から単離、抽出、もしくは別のやり方で処理しようと試みるあらゆる用途において用いられる。様々な別の実施形態において、目的物質はタンパク質、DNA、RNA、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の巨大分子もしくはこれらの組合せである。ある場合には、沈降物をペレット化する必要がない可能性がある。別の実施形態においては、管はフィルターが挿入される前に穴を開けられるであろうし、別の実施形態では、単一のステップにおいて管に穴を開けることをフィルターの挿入と組み合わせることができるであろう。

【0033】

前記のように、本発明の様々なステップを実施する多くの利用可能な手段が存在する。別の実施形態においては、本発明のいくつかのあるいは全てのステップが、人の介在により、あるいは人の介在なしに自動化された装置により実施される。本発明には開示の方法の各ステップを実施するこれらの手段のあらゆる可能な組合せおよび置換が含まれると想定されている。

【0034】

ここで図16に注意を向けると、本発明のさらに別の実施形態において、少なくとも1つの物質を保持できる容器内の少なくとも1つの物質を処理する方法が提供される。この方法には、容器に少なくとも1つの物質を導入すること(1601)が含まれる。この方法には少なくとも1つの物質を処理すること(1602)がさらに含まれる。この方法には容器に開口部をつくること(1603)ならびに開口部を通して少なくとも1つの物質を除去すること(1604)がさらに含まれる。

【0035】

別の実施形態において、この容器は開いた端部と閉じた端部をもつ。

【0036】

別の実施形態において、この方法は濾過手段を挿入することをさらに含む。別の実施形態においては、濾過手段は容器に導入された1つまたは複数の物質を保持する。別の実施形態において、この少なくとも1つの物質にはフィルターがさらに含まれる。

【0037】

別の実施形態において、容器の開口部は一般に閉じた端部につくられる。様々な実施形態において、容器はプラスチック、ゴム、熱可塑性材料もしくは本発明に従って穴を開けることができる、当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の何らかの材料からなる。

【0038】

別の実施形態において、容器は試験管、シリンダー、球、カップ、キャビティ(cavity)、凹んだ表面、矩形の(rectangular)キャビティ、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の適切な何らかの容器である。さらに別の実施形態において、容器には開いた端部がないかあるいは完全に閉じていてもよい。

【0039】

別の実施形態において、開口部をつくることは容器に穴を開けることをさらに含む。別の実施形態において、穴を開けることは、先の尖った、一般に円柱形の部材で本体もしくは容器を貫通させることをさらに含む。別の実施形態において、穴を開けることは、一般に楔形の部材、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の適切な何らかの穴を開ける器具で、容器の本体を貫通することをさらに含む。さらに別の実施形態において、開口部は局所的な溶融、割れ、蒸発、化学反応もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の適切な何らかの、開口部をつくる手段によりつくられる。

【0040】

さらに別の実施形態において、開口部は十分に小さく、開口部を通して重力に

より流体が流出することを実質的に防ぐ。別の実施形態において、本方法は、開口部を通しての流体の望ましくない流出を防ぐために、試験管の開いた端部をシールするステップをさらに含む。

【0041】

別の実施形態において、目的物質と不要物質を含む試料物質から目的物質を単離する方法が提供される。この方法には、試験管に、再び外せるような仕方で選択的に目的物質と不要物質を保持するための濾過手段もしくは物質を挿入することが含まれる。この方法にはまた、試験管に、任意の順序で、(i) 試料物質および(ii) 第1の試薬を加えることが含まれる。この方法には、試料物質と第1の試薬を混合して処理試料物質ならびに目的物質および不要物質を含む沈殿を生成することが含まれる。この方法には、沈殿を試験管の端部に追いやることが含まれる。別の実施形態において、この端部は閉じた端部もしくは開いた端部であろう。方法にはまた試験管の閉じた端部に開口部をつくることが含まれる。この方法には、処理試料流体が濾過手段を通過し、そして沈殿が濾過手段上に保持されるようにして、開口部を通して処理試料物質が試験管から出て行くようになることが含まれる。この方法にはまた、第2の試薬が必要であるかもしくは望ましい場合、試験管に第2の試薬を加えることが含まれる。濾過手段は、第1もしくは第2の試薬が濾過手段と接触するとき、選択的に不要物質を再び外しまた選択的に目的物質を保持する。この方法にはまた、開口部を通して第2の試薬および不要物質が試験管から出て行くようになることが含まれる。この方法には、第3の試薬が必要であるかもしくは望ましい場合、試験管に第3の試薬を加えることが含まれる。第3の試薬は濾過手段から第2の試薬の痕跡を除去する。この方法にはまた、開口部を通して第3の試薬および第2試薬の痕跡が試験管から出るようにすることが含まれる。この方法には、第4の試薬が必要であるかもしくは望ましい場合、試験管に第4の試薬を加えることが含まれる。濾過手段は、第4の試薬が濾過手段と接触するとき、目的物質を再び外す。この方法には、開口部を通して第4の試薬および目的物質が試験管から出て行くようになることが含まれる。第4の、またはこの実施形態において最終の試薬および目的物質は開口部を通って試料容器に直接流れ込む。当分野の技術者にすぐに思い浮かぶ

であろうように、4回の繰返しまたは4種の試薬の可能性がこの実施形態例において示されている。様々な別の実施形態において、任意の数もしくは系列の処理の繰返しあるいは試薬の数が、洗浄、保持、希釈あるいは望ましい結果を得るためにあるやり方での処理のために用いられる。さらに別の実施形態において、目的物質は管から出されることがない。代わりに、その物質は保持される。

【0042】

別の実施形態において、濾過手段には、ガラス纖維フィルター、フィルター、ビーズ、ガラス・ビーズ、ゲル、シリカゲル、容器の表面、あるいは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の何らかの基材もしくは物質が含まれる。

【0043】

様々な実施形態において、目的物質には、巨大分子、バイオ分子、タンパク質、核酸、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の何らかの目的物質が含まれる。

【0044】

別の実施形態において、試料物質には遠心された培養菌体からの上清が含まれる。

【0045】

さらに別の実施形態において、第1の試薬は目的物質の凝集と沈殿を促進する。別の実施形態において、第1の試薬にはPEG溶液が含まれる。さらに別の実施形態において、試料物質と第1の試薬の混合は、試験管の急激な周期運動により実施される。別の実施形態においては、物質の吸引と分配、当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の何らかの混合方法。

【0046】

別の実施形態において、開口部を跨ぐ圧力差を作り出すことにより、処理された試料流体が試験管から出て行くようにし、この圧力差は開口部を通して処理試料流体を出て行かせるのに十分なものである。別の実施形態において、圧力差は試験管の閉じた端部を減圧することにより生み出される。

【0047】

様々な実施形態において、必要で望ましい場合における第2の試薬には、d e

kaotropic 塩溶液、過塩素酸ナトリウム溶液、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の何らかの試薬が含まれる。別の実施形態において、開口部を跨ぐ圧力差を作り出すことにより、必要で望ましい場合における第2の試薬および不要物質が試験管から出て行くようにし、この圧力差は開口部を通して第2の試薬と不要物質を出て行かせるのに十分なものである。

【0048】

別の実施形態において、必要で望ましい場合における第3の試薬には、エタノール溶液が含まれる。別の実施形態において、開口部を跨ぐ圧力差を作り出すことにより、必要で望ましい場合における第3の試薬および必要で望ましい場合における第2の試薬の痕跡が試験管から出て行くようにし、この圧力差は開口部を通して第3の試薬および第2の試薬の痕跡を出て行かせるのに十分なものである。

【0049】

様々な実施形態において、必要で望ましい場合における第4の試薬には、生物学的懸濁ハッファおよび2価カチオン・スカベンジャー、TE ブッファ、もしくは当分野の技術者に思い浮かぶであろう他の何らかの試薬が含まれる。

【0050】

別の実施形態において、遠心することにより、必要で望ましい場合における第4の試薬および目的物質が試験管から出て行くようにする。別の実施形態において、開口部を跨ぐ圧力差を作り出すことにより、必要で望ましい場合における第4の試薬および目的物質が試験管から出て行くようにし、この圧力差は開口部を通して必要で望ましい場合における第4の試薬および目的物質を出て行かせるのに十分なものである。別の実施形態において、この圧力差は、試験管の開いた端部に陽圧を加えることにより生み出される。

【0051】

別の実施形態において、ステップの少なくとも1つが複数の試験管もしくは容器で同時に実施される。別の実施形態において、試験管もしくは容器は矩形配列で配置される。別の実施形態において、矩形配列は8列からなり、各列は12個の試験管を含む。

【0052】

別の実施形態において、ステップの少なくとも1つは自動制御される。別の実施形態においては、全てのステップが自動制御される。

【0053】

別の実施形態において、本方法には、管もしくは容器の端部に向かって沈殿を移動させる前に、試験管もしくは容器の閉じた端部に開口部をつくることが含まれる。

【0054】

開示のために、現時点で本発明の実施形態例であると思われるものを示し記載したが、本発明の精神と範囲から逸脱することなく、構成、組合せもしくは形状、あるいは部品の寸法もしくは配置、あるいは他の特性の詳細に、別のものを使用することができ、また変更を加えることができるということが、当分野の技術者には理解されるであろう。したがって、本発明をこれらの実施形態に限定しないことが望ましく、また添付の特許請求の範囲は本発明の精神と範囲内にある全てのこののような変更を含むと見なされている。

【図面の簡単な説明】**【図1】**

実施形態例の容器の横断面図である。

【図2】

平坦な閉じた端部を有する実施形態例の容器の横断面図である。

【図3】

濾過手段がビーズを含む実施形態例の容器の横断面図である。

【図4】

濾過手段がゲルもしくは適切な他の物質を含む実施形態例の容器の横断面図である。

【図5】

閉じた端部の内側に凹部分を有する実施形態例の容器の横断面図である。

【図6】

濾過手段が閉じた端部から離れている実施形態例の容器を示す図である。

【図7】

2重層濾過手段を有する実施形態例の容器の横断面図である。

【図8】

aおよびbとも、閉じた端部の内側に一体をなす支持体を有する実施形態例の容器のアイソメトリック破断図である。

【図9】

閉じた端部の内側に一連の溝を有する実施形態例の容器のアイソメトリック破断図である。

【図10】

方法の実施形態例で用いられる容器およびフィルターの例のアイソメトリック図である。

【図11】

挿入されたフィルターをもつ容器の横断面図である。

【図12】

穴をあけられた容器を示す図である。

【図13】

減圧下開口部を通して排出される流体を示す図である。

【図14】

陽圧を加えて取り出されている目的物質を示す図である。

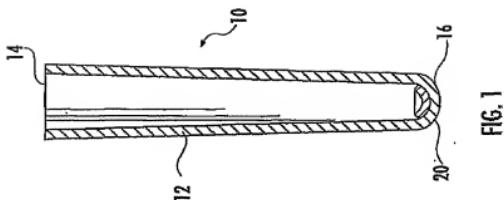
【図15】

容器の96ウェル・フォーマット配置の例を示す図である。

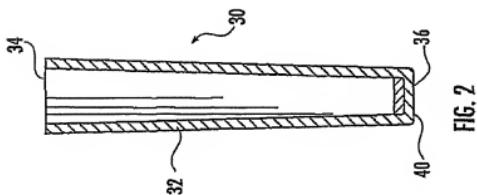
【図16】

本発明の方法の実施形態例を示す図である。

【図1】



【図2】



【図3】

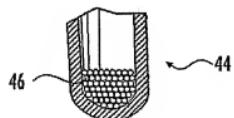


FIG. 3

【図4】

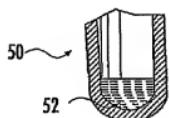


FIG. 4

【図5】

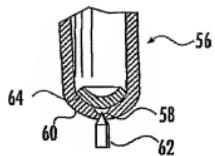


FIG. 5

【図6】

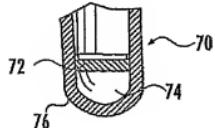


FIG. 6

【図7】

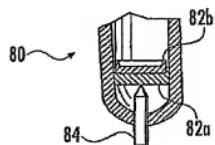


FIG. 7

【図8 a】

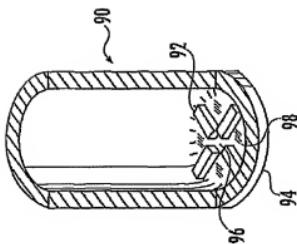


FIG. 8a

【図8b】

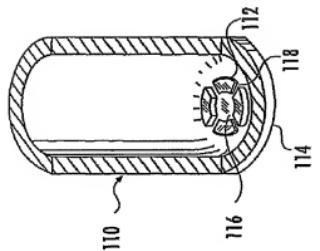


FIG. 8b

【図9】

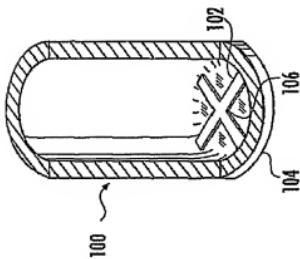


FIG. 9

【図10】

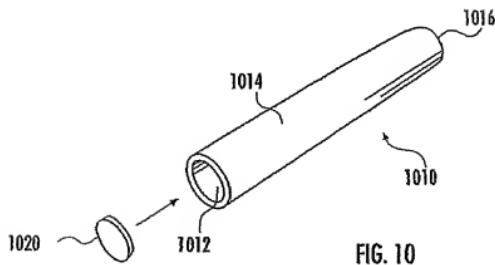


FIG. 10

【図11】

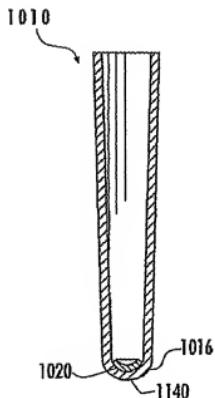


FIG. 11

【図12】

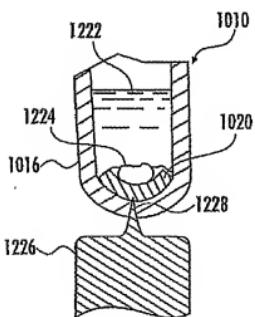
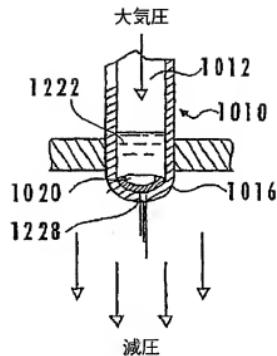
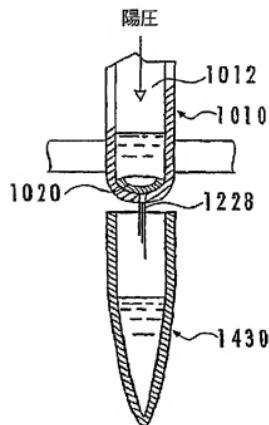


FIG. 12

【図13】



【図14】



【図15】

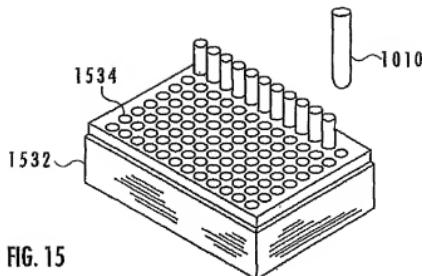
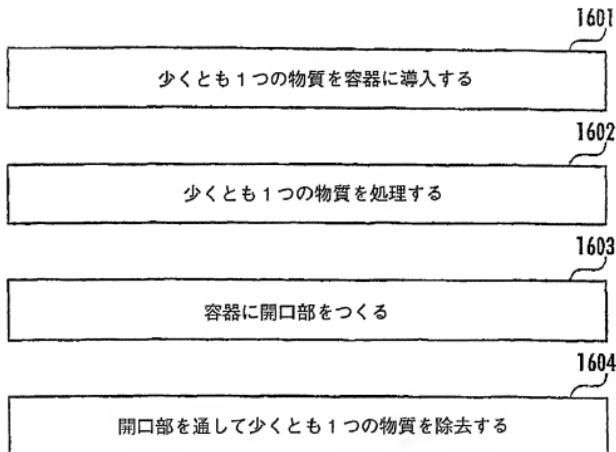


FIG. 15

【図16】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		Intern'l Application No. PCT/US 01/09090
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01L3/00 B01L3/14		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01L		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 01221 A (KONRAD RENATE ; WEBER LUTZ (DE) ; EHRFELD WOLFGANG (DE) ; INST MIKRO) 14 January 1999 (1999-01-14) abstract; claims 1-4,14,23; figures 1-5,8 page 6, line 15 -page 6, line 18 page 7, line 9 -page 7, line 13	1-5
Y	—	6-8
X	EP 0 329 120 A (RMS LAB INC ; DIFCO LAB (US)) 23 August 1989 (1989-08-23) abstract; figure 3 column 5, line 19 -column 6, line 45	2
Y	—	8
A	—	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of classifications:</p> <p>*A* documents defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date which may throw doubt on priority, claiming or which is otherwise of interest in the examination of another application for special reasons (see specification)</p> <p>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other reason</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		
<p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but which may cast doubt on the priority or otherwise undermine the invention</p> <p>*X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or cannot be granted a patent if it involves an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or cannot be granted a patent if it involves an inventive step when the document is taken together with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>*X* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 18 October 2001		Date of mailing of the international search report 26/10/2001
Name and mailing address of the ISA Commission of Patents, P.O. 3818 PatentBox 2 102323 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 346-2040; Fax: 31 651 894-3918		Authorized officer Runser, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Search Application No.
PCT/US 01/09090

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Classification of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Patent to claim No.
Y	US 3 931 010 A (AYRES WALDEMAR A ET AL) 6 January 1976 (1976-01-06) abstract; figure 1	6,7
A	US 4 358 425 A (FINNEY JACK P ET AL) 9 November 1982 (1982-11-09) abstract; figure 1	1,2
A	_____	1,2,6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/09090

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9901221	A	14-01-1999	DE 19828995 A1 WO 9901221 A1	11-02-1999 14-01-1999
EP 0329120	A	23-08-1989	US 5035866 A US 4985631 A AT 132970 T DE 68925370 D1 DE 68925370 T2 EP 0329120 A2 US 5772967 A US 5159197 A	30-07-1991 15-01-1991 15-01-1996 22-02-1996 14-11-1996 23-08-1989 30-06-1998 27-10-1992
US 3931010	A	06-01-1976	NONE	
US 4358425	A	09-11-1982	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY,
DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, I
T, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF
, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, G
M, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ
, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ,
MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, B
Z, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK
, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, J
P, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR
, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, R
O, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ
, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,
YU, ZA, ZW